

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno – biotehnološki fakultet u Zagrebu
Preddiplomski studij Nutricionizam

Monika Ivanković

6698/N

**STABILNOST NAPITKA OD LISTA MASLINE TIJEKOM
SKLADIŠTENJA PRI SNIŽENOJ TEMPERATURI**

ZAVRŠNI RAD

Naslov znanstveno-istraživačkog ili stručnog projekta: Primjena inovativnih tehnologija u proizvodnji biljnih ekstrakata kao sastojaka funkcionalne hrane (IT-PE-FF)

Mentor: Prof.dr.sc.Branka Levaj

Zagreb, 2017.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski studij Nutricionizam

Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo

Laboratorij za procese konzerviranja i preradu voća i povrća

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

STABILNOST NAPITKA OD LISTA MASLINE TIJEKOM SKLADIŠTENJA PRI SNIŽENOJ TEMPERATURI

Monika Ivanković, 0058203048

Sažetak: U ovome radu cilj je bio ispitati stabilnost napitka od lista masline tijekom 12 tjedana skladištenja pri temperaturi od 8 °C. Svojstva koja su se pratila i analize koje su se provodile su: boja (CIELAB metodom), senzorska svojstva (kvalitativnom deskriptivnom analizom), koncentracija ukupnih fenola (pomoću Folin-Ciocalteu reagensa), antioksidacijski kapacitet (DPPH metodom) te mikrobiološka svojstva. Rezultati pokazuju da se povećanje a, b, C i ΔE vrijednosti te smanjenje L i H^0 vrijednosti. Koncentracija fenola se vremenom nije značajnije smanjila, kao ni antioksidacijski kapacitet. Skladištenjem su se senzorska svojstva mijenjala i to tako da su se smanjili intenzitet žute boje, miris na list masline, trpki okus, strani miris, a povećao se intenzitet smeđe boje te harmoničnost okusa. Mikrobiološka ispitivanja ukazuju na prihvatljivu stabilnost napitka tijekom skladištenja.

Ključne riječi: antioksidacijski kapacitet, list masline, napitak, skladištenje, ukupni fenoli

Rad sadrži: 31 stranica, 7 slika, 3 tablica, 55 literaturnih navoda, 1 prilog

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Prof.dr.sc. Branka Levaj

Pomoć pri izradi: Dr.sc. Maja Repajić

Datum obrane: 18. rujna 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

University undergraduate study Nutrition

Department of Food Engineering

Laboratory for Technology of Fruits and Vegetables Preservation and Processing

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

THE STABILITY OF OLIVE LEAF DRINK DURING STORAGE AT LOW TEMPERATURE

Monika Ivanković, 0058203048

Abstract: In this study, the purpose was to examine the stability of olive leaf drink during 12 weeks of storage at 8 °C. Properties and analyses which were carried out are: color (CIELAB method), sensory properties (qualitative descriptive analysis), concentration of total phenol (with Folin-Ciocalteu reagent), antioxidant capacity (DPPH method) and microbiological properties. Results show that a, b, C and ΔE values were increased, while L and H^o values were decreased. Concentration of total phenol was not significantly reduced and neither was antioxidant capacity. During storage sensory properties changed and showed reduction of yellow color, smell of olive leaf, olive leaf taste, sourness, bitterness, olive leaf aroma and green aroma, while brown color and harmonious taste increased. Microbiological tests indicate satisfactory stability of drink during storage.

Keywords: antioxidant capacity, olive leaf, drink, storage, total phenol

Thesis contains: 31 pages, 7 figures, 3 tables, 55 references, 1 supplement

Original in: Croatian

Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Prof.dr.sc. Branka Levaj

Technical support and assistance: Dr.sc. Maja Repajić

Defence date: September 18th 2017

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. List masline.....	2
2.2. Upotreba lista masline.....	2
2.2.1. Upotreba lista masline u današnje doba.....	3
2.3. Sastav lista masline.....	4
2.3.1. Fenolni sastav lista masline.....	4
2.3.2. Oleuropein.....	4
2.4. Stabilnost fenolnih spojeva u svježem listu masline i u vodenom ekstraktu.....	5
2.5. Utjecaj abiotičkih i biotičkih faktora na list masline.....	6
2.5.2. Abiotički faktori.....	7
2.5.3. Biotički faktori.....	7
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	8
3.1. Materijali.....	8
3.1.1. Napitak od lista masline.....	8
3.1.2. Otapala i reagensi.....	9
3.1.3. Aparatura i pribor.....	10
3.2. Metode rada.....	11
3.2.1. Određivanje koncentracije ukupnih fenola.....	11
3.2.2. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom.....	13
3.2.3. Određivanje boje CIELAB metodom.....	15
3.2.4. Određivanje senzorskih svojstava napitka.....	16
3.2.5. Određivanje mikrobiološke aktivnosti.....	17
3.3. Rezultati i rasprava.....	18
4. ZAKLJUČAK.....	25
5. LITERATURA.....	26
6. PRILOZI	

1. UVOD

Stablo masline uzgaja se od davnina, ponajviše u Mediteranskom području. Tijekom protekla dva desetljeća uzgoj se proširio na cijeli svijet, upravo zbog zdravstvenih učinaka koje maslina ima na zdravlje čovjeka. Međutim, tijekom berbe maslina i proizvodnje maslinovog ulja, drugi dijelovi biljke zaostaju te se neki iskoriste, dok se drugi bacaju neiskorišteni.

Jedan od tih zaostalih dijelova je i list masline. List masline smatra se nusproduktom koji zaostaje tijekom uzgoja masline i proizvodnje maslinovog ulja te predstavlja 10 % ukupne mase prikupljenih maslina za proizvodnju ulja. Lišće je oduvijek izazivalo interes, pogotovo u narodnoj medicini gdje se koristilo za suzbijanje vrućice i liječenje bolesti kao što je malarija. Polifenoli koji se nalaze u listu imaju značajnu ulogu u sastavu zbog svojih antikancerogenih, antiupalnih i antimikrobnih svojstava. Znanstvenicima najzanimljiviji fenoli koji se nalaze u listu su oleuropein i hidroksitirozol, koji imaju snažna antioksidacijska djelovanja.

Kemijska, agronomska i medicinska istraživanja zajedno su istaknula kako list masline može biti potencijalni izvor fenolnih spojeva za proizvodnju funkcionalne hrane i nutraceutika.

Komercijalna proizvodnja čaja i dodataka prehrani prisutna je u cijelom svijetu, a dolazi u obliku osušenog lišća, praha, ekstrakta ili tableta.

Cilj ovog rada bio je ispitati stabilnost napitka od lista masline pri 8 °C tijekom skladištenja u trajanju od 12 tjedana. Tijekom skladištenja su praćene promjene boje, senzorskih svojstava, koncentracije ukupnih fenola, antioksidacijskog kapaciteta te mikrobioloških svojstava.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. List masline

Nusprodukti dobiveni iz drva masline i ekstrakcije maslinovog ulja su poznati kao "nusprodukti masline". Velik broj nusprodukata i ostataka dobivenih iz berbe maslina i industrije su sačuvani tijekom godina, iako većina nema nikakvu praktičnu upotrebu. Naime, zaostala masa smatrala se velikim, jeftinim i neiskorištenim izvorom energije i kemikalija (Talhaoui i sur., 2015.). List masline se može naći u velikim količinama kao nusprodukt u industriji prerade maslina. Pojam "lista masline" označava mješavinu listova i grančica sačuvanih tijekom obrezivanja drva masline te čišćenja i branja maslina (Molina-Alcaide i sur., 2008.).

Studije pokazuju kako je lišće masline bogato različitim fenolnim spojevima, ponajviše oleuropeinom i hidroksitirisolom. (Benavente-Garcia i sur., 2000.). Upravo zbog tih svojstava, lišće se koristi u farmaceutskoj, kozmetičkoj i prehrambenoj industriji (Erbay i Icier, 2010.).



Slika 1. List masline (Anonymous 1)

2.2. Upotreba lista masline

Prva medicinska upotreba lista masline bila je u antičkom Egiptu, gdje je list bio simbol božanske snage. Koristili su ulje dobiveno ekstrakcijom lista u ceremonijama mumificiranja. List se također koristio u tretmanima protiv gripe, prehlade, malarije te raznih infekcija. Čaj od lista masline je postao vrlo popularan u Engleskoj, budući da su pripremali čaj od lista masline kojeg su davali bolesnim mornarima u doba kolonijalizma (Gao i sur., 2008.).

2.2.1. Upotreba lista masline u današnje doba

Iako se list masline upotrebljavao od davnina, tek je od nedavno počeo izazivati značajni interes prehrambene i farmaceutske industrije. Naime, nekoliko farmaceutskih proizvođača nude dodatke koje sadrže list masline u obliku tekućeg ekstrakta ili tablete za liječenje dijabetesa, visokog krvnog tlaka, kardiovaskularnih bolesti, prehlade i raznih infekcija. Također, proizvodi koji sadrže ekstrakt lista masline koriste se za tretmane protiv starenja u kozmetičkoj industriji. Lijekovi koji sadrže ekstrakt ne koriste se samo za liječenje ljudi, nego se koriste i u antibioticima za liječenje životinja (Salem i sur., 2015.).



Slika 2. Ekstrakt lista masline u obliku kapsule (Anonymous 2, 2016.)

List masline ima potencijalnu upotrebu u mliječnim proizvodima, zbog svoje sposobnosti da poveća nutritivnu vrijednost fermentiranog mlijeka bez negativnog utjecaja na aktivnost bakterija mliječne kiseline (*Streptococcus thermophilus* i *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* koje su prirodno prisutne u mlijeku) (Haddadin 2010). Haddadin je proveo studiju utjecaja ekstrakta lista masline (vodeni, etanolni i metanolni ekstrakt) na broj stanica i stvaranje kratkolančanih masnih kiselina iz bakterija ljudskog probavnog sustava (*Bifidobacterium infantis* i *Lactobacillus acidophilus*) u rekonstruiranom obranom mlijeku. Zaključak je da sva tri ekstrakta povećavaju broj stanica i krajnje vrijednosti kratkolančanih masnih kiselina, te povećaju koncentraciju octene kiseline koju izlučuje bakterija *Lactobacillus acidophilus*. Također, Marhamatizadeh i sur. (2013.) su istraživali utjecaj ekstrakta lista masline na rast i aktivnost *L. acidophilus* i *Bifidobacterium bifidum* bakterija u mlijeku i jogurtu tijekom skladištenja u hladnjaku u trajanju od 21 dana. Zaključak je da su na kraju skladištenja bile prisutne puno veće koncentracije bakterija nego kod mlijeka i jogurta koji nisu sadržavali ekstrakte.

Razvoj brzih metoda za obogaćivanje jestivih ulja s biofenolima maslinova lista stvaraju velik interes. Metoda ekstrakcije tekuće-tekuće razvijena je kako bi se maslinovo, suncokretovo i sojino ulje obogatili biofenolima iz ekstrakta lista masline, kako bi imala veću nutritivnu vrijednost (Japon-Lujan i sur., 2008).

2.3. Sastav lista masline

Kemijska struktura lista masline ovisi o nekoliko faktora, kao što su porijeklo biljke, veličina grančica, uvjeti skladištenja, klimatski uvjeti, količina vlage i stupanj onečišćenja zemljom i ostalim nečistoćama (Silva i sur., 2006.).

Sadržaj sirovih proteina je u rasponu od 9,5 do 12,9 % (Delgado-Pertinez, 2000.). Aminokiseline koje su prisutne u najvećoj mjeri su arginin, leucin, prolin, glicin, valin i alanin (Martin-Garcia i sur., 2003.).

Međutim, najvažniji sastojci lista masline su fenolni spojevi, od kojih su najviše prisutni oleuropein, hidroksitirozol, verbaksozid, apigenin-7-glukozid i leuteolin-7-glukozid (Benavete-Garcia i sur., 2000.)

2.3.1. Fenolni sastav lista masline

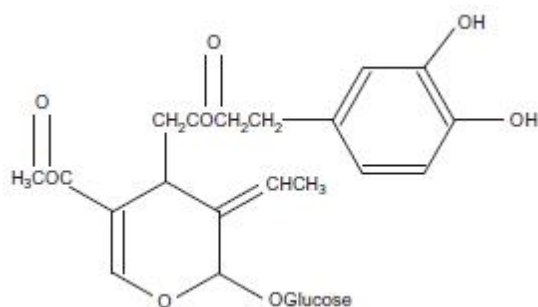
Fenolni spojevi ili polifenoli nastaju kao posljedica reakcije na napad patogena i odgovor na ozljede od insekata (Japon-Lujan i sur., 2006.). To su sekundarni metaboliti koji nastaju u biljkama različitim metaboličkim putovima, kao što su pentoza-fosfatni put te put šikimeinske kiseline. List masline sadrži veliki broj fenolnih spojeva, a oni se mogu podijeliti na jednostavne fenole, flavonoide (flavoni, flavanoli, flavonoli i 3-flavanoli) i sekoiridoidie. Karakteristični fenoli za list masline su sekoiridoidi (karakteristični isključivo za obitelj Oleaceae) (Talhaoui i sur., 2015.). Najpoznatiji pripadnik grupe sekoiridoida je oleuropein.

2.3.2. Oleuropein

Bourquelot i Vintilesco su 1908. godine prvi put izolirani spoj oleuropein iz masline. Definirali su ga kao biofenol glukozid gorkog okusa, topljiv u vodi i alkoholu, a netopljiv u eteru. Iduće studije su potvrdile njegovu strukturu estera koja se sastoji od elenolne kiseline i hidroksitirosola. Naime, Benavente-Garcia i sur. (2000.) istraživali su kvalitativni i

kvantitativni sastav fenola u ekstraktu lista masline i njihov antioksidacijski kapacitet . Prema njihovim rezultatima, glavni fenolni spoj u lišću masline je oleuropein.

Oleuropein je heterozidni ester elenolne kiseline i dihidroksi fenil etanola (Pannizzi i sur., 1960.). Sadrži orto-difenolnu (katehol) strukturu koja djeluje kao antioksidans (Tuck i Hayball, 2002.) i glavni je razlog visokog antioksidacijskog kapaciteta oleuropeina (Benavente-Garcia i sur., 2000.). Glavni produkt razgradnje oleuropeina je hidroksitirozol, čija je glavna karakteristika veliki antioksidacijski kapacitet (Erbay i Icier, 2010.).



Slika 3. Kemijska struktura oleuropeina (Erbay i Icier, 2010.)

2.4. Stabilnost fenolnih spojeva u svježem listu masline i u vodenom ekstraktu

Braun i sur. (2015.) navode kako ekstrakti mogu biti djelotvorniji nego izolirane komponente, budući da bioaktivna individualna komponenta može mijenjati svojstva u prisutnosti druge komponente prisutne u ekstraktu. Pa tako su najučinkovitiji proizvodi od lista masline proizvedeni direktno iz svježih listova kako bi se osigurao cijeli spektar prirodnih biofenola, koji zajedno djeluju u prirodnoj sinergiji i povećaju dobrobiti proizvoda za ljudsko zdravlje. Također, flavonoidi, rutin, katehin i luteoin imaju gotovo dva puta veću antioksidacijsku aktivnost od vitamina C. A Savarese i sur. (2007.) navode kako je antioksidacijska aktivnost oleuropeina i hidroksitrozola gotovo jednaka onoj koju sadrže vitamini C i E.

Priprema prije ekstrakcije lista značajno utječe na količinu flavonoida i fenola u ekstraktu. Provedeno je istraživanje koje je imalo cilj procijeniti učinak temperature sušenja na količinu oleuropeina. Lišće masline bilo je sušeno između 25 i 150 °C te je bilo zamrznuto nakon toga. Specifična temperatura sušenja između 65 i 80 °C rezultirala je smanjenjem koncentracije

oleuropeina u lišću masline. Međutim, nakon toga je lišće bilo tretirano kipućom vodom te se koncentracija oleuropeina povećala. (Hata, 2004.).

Malik i sur. (2008.) su potvrdili rezultate ovog istraživanja. Naime, oleuropein je bio veoma stabilan u vodenom ekstraktu tijekom 7 dana na sobnoj temperaturi, ali se nakon 17 dana razgradio. Ostali biofenoli su bili manje stabilni u vodenoj otopini i počeli su se razgrađivati već nakon 7 dana, a nakon 17 dana su se potpuno razgradili. Iste komponente su u metanolnom ekstraktu bili stabilni i nakon 30 dana stajanja na sobnoj temperaturi.

Kamran i sur. (2015.) su otkrili da je lišće sušeno pri 105 °C pokazuje veći porast koncentracije fenola i oleuropeina nego u svježem lišću. U istraživanju navode kako bi lišće trebalo biti dehidrirano pri 105 °C 3 sata prije ekstrakcije da bi se sačuvala najveća koncentracija oleuropeina i drugih biofenola.

Ahmad-Quasem i sur. (2016.) su ispitivali utjecaje različitih uvjeta sušenja i skladištenja ekstrakta lista masline. Lišće masline je sušeno vrućim zrakom pri 120 °C i nakon toga je zamrznuto. Ekstrakti, u obliku praha i tekućine su bili skladišteni pri 4, 25 i 35 °C tijekom 4 tjedna. Sušenje je utjecalo na početni sastav fenola ekstrakta i na bioaktivna svojstva tijekom skladištenja. Zaključak istraživanja je da uvjeti skladištenja nisu imali značajan utjecaj na antioksidacijsku aktivnost ekstrakta.

2.5. Utjecaj abiotičkih i biotičkih faktora na list masline

Stablo masline je neprestano izloženo okolišnom stresu, kao što su visoka temperatura i UV-zračenje. U svrhu zaštite, biljka proizvodi razne biofenole kao što su fenolna kiselina, fenolni alkoholi, sekoiridoidi i flavonoidi. Fenolni spojevi mogu biti osjetljivi na razne faktore koji mogu promijeniti kvalitativni i kvantitativni sastav lista, a mogu se podijeliti na abiotičke i biotičke. Abiotički faktori su neživi kemijski i fizikalni dijelovi okoliša koji utječu na žive organizme i funkcioniranje ekosistema. Neki od njih su: voda, zrak, temperatura, vlaga i svjetlost. S druge strane, biotički faktori su živi organizmi koji utječu na druge organizme. To su biljke, gljivice, bakterije, ali i životinjski i ljudski utjecaj. (Talhaoui i sur., 2015.)

2.5.1. Abiotički faktori

Nedostatak vode (suša)

Maslina je poznata kao biljka koja dobro podnosi nedostatak vode. Mogućnost masline da se prilagodi dostupnosti vode uključuje promjene na listu vezane za morfološka, anatomska i fiziološka svojstva (Ennajeh i sur., 2009.). Zapravo, pri takvim ekološkim uvjetima, izlučivanje fenolnih komponenata se povećava, tj. koncentracija oleuropeina se povećava kao odgovor na stres uzrokovan nedostatkom vode. Ova značajka važna je u antioksidacijskom mehanizmu masline. Naime, oleuropein i ostali sekundarni metaboliti kao što su hidroksitirozol i verbaskosidi imaju takva svojstva da se odlično ponašaju kao biljni antioksidansi (Petridis i sur., 2012.).

Svjetlost

UV zračenje može biti izuzetno štetno za biljku masline, međutim prisutnost flavonoida i ostalih fenola omogućuje zaštitu protiv štete uzrokovane zračenjem. Razlog je njihov apsorpcijski maksimum u UV području. Naime, lišće ostavljeno na sunčevoj svjetlosti imalo je značajno veću koncentraciju oleuropeina i flavonoida u odnosu na lišće koje je bilo u sjeni (Melgar i sur., 2009.).

2.5.2. Biotički faktori

Bakterije

Antimikrobiološke studije pokazale su kako otpornost fenola na bakterije može koristiti ne samo za ljudsko zdravlje, nego i za zaštitu poljoprivrednih kultura. Prirodna otpornost stabla masline može se opisati prisutnosti fizičke barijere kristala oleanolične kiseline na površini lista masline i izlučivanju sekoiridoida glukozida, oleuropeina (Kubo i sur., 1995.).

Od ostalih značajnih biotičkih faktora može se spomenuti otpornost na gljivice, genotip lista masline te starost lista (zrelije lišće ima veću količinu flavonoida i fenola nego mlado lišće) (Ranalli i sur., 2006.).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Napitak od lista masline

U ovom istraživanju korišteno je lišće masline mješavine sorata Orkula (90%), Leccina (5%), Garbunčela i Marokanka. Lišće je prikupljeno u masliniku u Republici Hrvatskoj, točnije u Ravnim Kotarima. Nakon toga lišće je preneseno na Prehrambeno-biotehnološki fakultet, gdje je bilo rašireno po stolu te sušeno tri dana na sobnoj temperaturi.

Za pripremu napitka određen je omjer 4 g lišća i 100 mL destilirane vode. Prije samog kuhanja lišće je oprano, sušeno i usitnjeno na dužinu od otprilike 1 cm. Nakon prethodne pripreme, lišće je kuhano 3 minute na temperaturi vrelišta te je odstajalo 10 minuta u vodi. Zatim je slijedilo cijedenje kako bi se odvojili listovi, a naposljetku se izvršila pasterizacija na 85 °C u trajanju od 10 sekundi.

Pripremljeni napitak je prebačen u prethodno oprane i sterilizirane staklenke te je hermetički zatvoren. Napitak je skladišten 84 dana (12 tjedana) pri temperaturi od 8 °C. Analize su provedene u svježe pripremljenom napitku (0.dan), 1., 21., 42., 63. te 84. dan skladištenja. Budući da su se analize određivanja ukupnih fenola i antioksidacijske aktivnosti provodile nakon što su prikupljeni svi uzorci, napitci za sve navedene dane su se smrzavali i čuvali na temperaturi od -80 °C, kako se njihova svojstva ne bi mijenjala.

3.1.2. Otapala i reagensi

- Folin-Ciocalteu reagens (Merck, Njemačka)
- Natrijev karbonat bezvodni (Grammol, Hrvatska)
- Zasićena otopina natrijeva karbonata (20%-tna otopina)
Priprema: 200 g anhidrida natrijeva karbonata otopi se u 800 mL vruće destilirane vode, a potom se ohladi na sobnu temperaturu. Doda se nekoliko kristalića natrijeva karbonata, nadopuni destiliranom vodom u odmjerne tikvici od 1000 mL i nakon 24 h filtrira.
- 100 %-tni metanol (Avantor Performance Materials, Poljska)
- DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal) (Sigma-Aldrich, Njemačka)
- Otopina 0,2 mM DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal)
Priprema: 0,0079 g 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikala se odvažuje u plastičnoj lađici za vaganje te kvantitativno prenese i otopi u 100%-tnom metanolu te nadopuni 100%-tnim metanolom do oznake u odmjerne tikvici od 100 mL. DPPH je potrebno čuvati na tamnome u zatvorenoj tikvici.
- Destilirana voda

3.1.3. Aparatura i pribor

Aparatura:

- Spektrofotometar
- Tehnička vaga K7 (Mettler, Zurich)
- Analitička vaga AX224 (Ohaus Corporation, SAD)
- Vortex MS2 (IKA, SAD)
- Kolorimetar CM-3500d (Konica Minolta, Japan)
- Vodena kupelj od rotavapora B-490 (Buchi Labortechnik AG, Švicarska)

Pribor:

- Odmjena tikvica
- Mikropipeta
- Staklena kiveta
- Menzura
- Epruvete
- Stalak za epruvete
- Plastična lađica za vaganje

3.2. Metode rada

3.2.1. Određivanje koncentracije ukupnih fenola

Princip metode

Određivanje ukupne koncentracije fenola temelji se na kolorimetrijskoj reakciji između Folin-Ciocalteu reagensa i reducirajućeg reagensa, polifenola. Folin-Ciocalteu reagens smjesa je dvije kiseline – fosfowolframove i fosfomolibdenske, koje se reduciraju u wolframov oksid i molibden oksid. Uz to, fenolne tvari koje su prisutne oksidiraju. Nastaje plavo obojeni kompleks koji je intenzivniji što je veći broj hidroksilnih skupina ili oksidirajućih grupa u fenolnim spojevima. Nastali intenzitet obojenja mjeri se pri valnoj duljini od 765 nm. (Shortle i sur., 2014.)

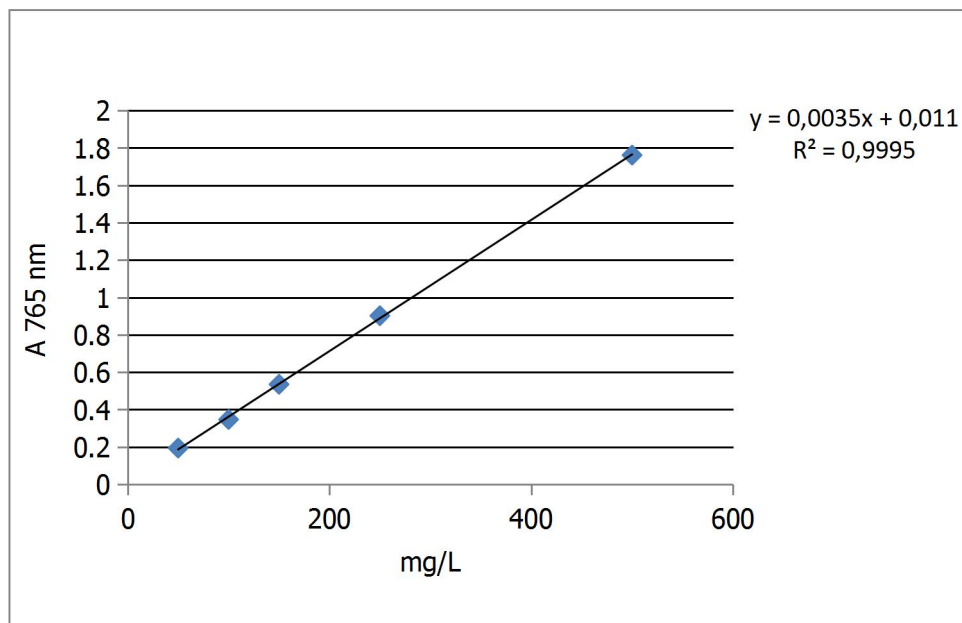
Postupak određivanja

U staklenu epruvetu otpipetira se 100 μ L ekstrakta, 200 μ L Folin Ciocalteu reagens, 2 mL destilirane vode i 1 mL zasićene otopine natrijeva karbonata. Sadržaj epruvete se promiješa pomoću Vortexa, a potom se uzorci termostatiraju 25 minuta pri 50 °C u vodenoj kupelji od rotavapora. Nakon toga se pomoću spektrofotometra mjeri apsorbancija pri valnoj duljini od 765 nm. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima otapalo.

Izrada baždarnog dijagrama

Za pripremu baždarnog dijagrama potrebno je odvagati 0,5 g galne kiseline, koja se potom otopi u 10 mL 96%-tnog etanola u odmjernoj tikvici od 100 mL i nadopuni destiliranom vodom do oznake. Pripremljena otopina služi za izradu razrjeđenja u odmjernim tikvicama od 100 mL. Redom se otpipetira 1, 2, 3, 5 i 10 mL alikvota standardne otopine galne kiseline u svaku tikvicu i nadopune se destiliranom vodom do oznake. Koncentracija galne kiseline u tikvicama iznosi 50, 100, 150, 250 i 500 mg/L. Iz svake tikvice otpipetira se 100 μ L otopine standarda u staklene epruvete te se redom dodaje 200 μ L Folin Ciocalteu reagensa, 2 mL destilirane vode i 1 mL zasićene otopine natrijeva karbonata. Sve skupa se promiješa pomoću Vortexa, a potom se uzorci termostatiraju 25 minuta pri 50 °C u vodenoj kupelji od rotavapora. Na isti način se priprema i slijepa proba, ali se umjesto otopine standarda uzima 100 μ L destilirane vode. Nakon toga se mjeri apsorbancija pri valnoj duljini od 765 nm. Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrtava se baždarni dijagram pomoću programa Microsoft Excel tako da se na apscisu nanese koncentracije galne kiseline (mg/L), a na ordinatu

izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 765 nm. Koncentracija ukupnih fenola izračuna se prema dobivenoj jednadžbi pravca.



Slika 4. Prikaz ovisnosti apsorbancije pri 765 nm o koncentraciji galne kiseline (mg/L)

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba glasi:

$$y = 0,0035 * x$$

gdje je:

y – apsorbancija pri 765 nm

x – koncentracija galne kiseline (mg/L)

Za svaki uzorak izmjerene su dvije apsorbancije koje su se uvrstile u jednadžbu dobivene baždarnim dijagramom. Od izračunatih koncentracija ukupnih fenola određena je srednja vrijednost i standardna devijacija.

3.2.2. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom

Princip metode

DPPH radikal (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) je stabilan dušikov radikal ljubičaste boje. Metoda određivanja antioksidacijskog kapaciteta pomoću DPPH radikala temelji se na sposobnosti antioksidansa da reducira slobodni radikal, tj. da dođe do sparivanja nesparenog elektrona U reakciji DPPH radikala s fenolima (fenoli iz napitka od lista masline) dolazi do promjene boje iz ljubičaste u žutu, što se na spektrofotometru bilježi kao pad apsorbancije pri 517 nm.

(Prior i sur., 2005.)

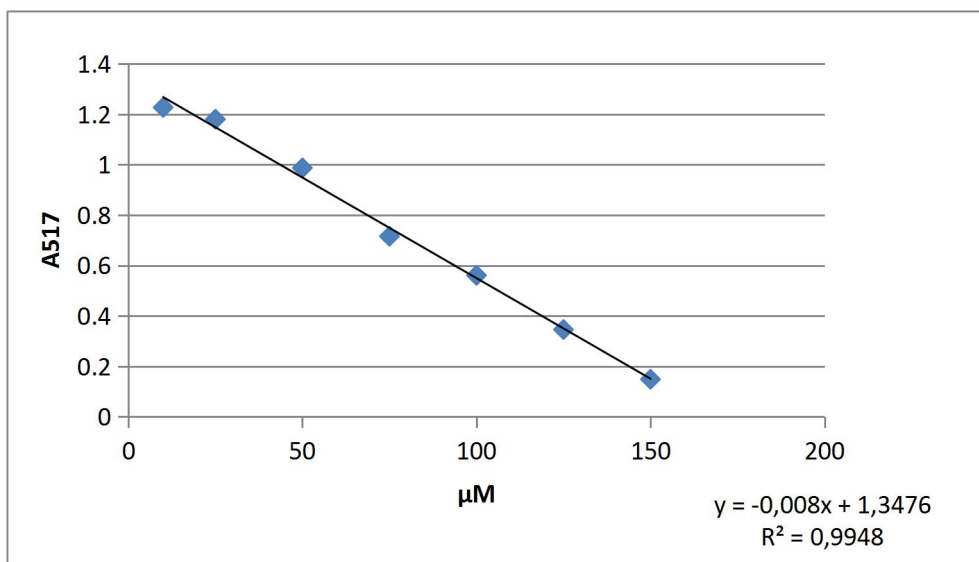
Postupak određivanja

U epruvetu se otpipetira 0,75 mL ekstrakta te 1,5 mL 0,2 mL prethodno svježe pripremljene otopine DPPH radikala (opis pripreme otopine je napisan u popisu otapala i reagensa). Za pripremu slijepa probe umjesto ekstrakta se koristi 2,25 mL 100%-tnog metanola. Epruvete sa sadržajem stoje 20 minuta u mraku pri sobnoj temperaturi, nakon čega se mjeri apsorbancija pri 517 nm.

Izrada baždarnog dijagrama

Za izradu baždarnog dijagrama pripremi se 1 mM otopina Troloxa (6-hidroksi-2,5,6,7,8-tetrametilkroman-2-karbonska kiselina). Otopina se priprema tako da se odvaži 0,025 g Troloxa, koji se zatim otopi u metanolu i nadopuni metanolom u odmjernoj tikvici od 100 mL. Od 1 mM otopine Troloxa pripreme se razrjeđenja u koncentracijama 10, 25, 50, 100, 125, 150 μ M.

U epruvetu se redom otpipetira 0,75 mL odgovarajuće otopine Troloxa te 1,5 mL 0,2 mM otopine DPPH. Za slijepu probu se u epruvetu otpipetira 2,25 mL 100%-tnog metanola. Epruvete sa sadržajem stoje 20 minuta u mraku pri sobnoj temperaturi, nakon čega se mjeri apsorbancija pri 517 nm, uz metanol kao slijepu probu.



Slika 5. Prikaz ovisnosti apsorbancije pri 517 nm o koncentraciji Troloxa (μM)

Jednadžba pravca glasi:

$$y = -0,008 * x$$

gdje je:

y = apsorbancija uzorka pri 517 nm

x = ekvivalent troloxa TAE (μM)

Za svaki uzorak napitka izmjerene su dvije apsorbancije koje su se uvrstile u jednadžbu dobivenu baždarnim dijagramom. Od izračunatih koncentracija određena je srednja vrijednost i standardna devijacija.

3.2.3. Određivanje boje CIELAB metodom

Princip metode

Objektivno mjerenje boje temelji se na parametrima trodimenzionalnog spektra boja (L^* , a^* i b^*) korištenjem uređaja koji radi na principu mjerenja stupnja reflektirane svjetlosti od mjerne površine. Parametar L^* je mjera svjetlosti iskazana vrijednostima od 0 do 100 (0=crveno, 100=bijelo). Vrijednost a^* je iskazana vrijednostima od -60 do 60, a iskazuje spektar od crvene (pozitivne vrijednosti) do zelene (negativne vrijednosti) boje, pri čemu veća pozitivna vrijednost karakterizira crveniju boju. Vrijednost b^* parametra ukazuje na spektar nijansi između žute i plave boje, a veća vrijednost označava izraženost žutog dijela spektra. (McGuire, 1992.). Kombinacijom a^* i b^* vrijednosti dobiva se boja uzorka, a L^* vrijednost predstavlja svjetlinu te boje.

Postupak određivanja

Skladištenom napitku od lista masline određivale su se L^* , a^* , b^* , H° i ΔE vrijednosti CIELAB metodom (CIE, 1976.). Prije mjerenja kolorimetar je baždaren bijelom i crnom pločicom isporučenima s instrumentom.

Izračunavanje

Iz vrijednosti a^* i b^* mogu se izračunati vrijednosti za ton, odnosno vizualni doživljaj boje (H°):

$$H^\circ = \arctan b/a$$

te se može izračunati i intenzitet, odnosno zasićenost boje (što su vrijednosti niže, to je zasićenost boje slabija):

$$C = (a^2 + b^2)^{1/2}$$

ΔE ili ukupna razlika obojenosti prikazuje razliku boja u odnosu na neku ishodnu točku (boju). Kao referentna vrijednost koristila se početna boja čaja (0. dan skladištenja):

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2}$$

3.2.4. Određivanje senzorskih svojstava napitka

Princip metode

Za određivanje pojedinih senzorskih svojstava napitka provedena je kvantitativna deskriptivna analiza (QDA). U ovoj metodi panelisti identificiraju i kvantitativno određuju osjetilna svojstva proizvoda i svojstva sastojaka.

Postupak određivanja

Senzorsko ispitivanje provela je panel grupa od 10 ocjenjivača. Upitnik je sadržavao opis pojedinih senzorskih svojstava: intenzitet boje (žuta i smeđa boja), miris (miris na list masline, strani miris), okus (trpki okus, gorki okus, okus na list masline, strani okus i harmonični okus) te aromu (svojstvena na list masline, na zeleno i strana aroma) (Stone i sur., 2012.). Uzorci su prije analize stavljeni na sobnu temperaturu kako bi se temperirali te su servirani u plastičnim čašicama. Senzorska svojstva napitka ocjenjivala su se skalom intenziteta u rasponu od 1 do 10, pri čemu je 1 označavalo neizraženo svojstvo, a 10 maksimalno izraženo svojstvo. Ocjenjivački list se nalazi u Prilogu 1.

Grafički prikaz

Posebna prednost ove metode je mogućnost grafičkog prikaza dobivenih rezultata pomoću tzv. paukove mreže (slika 7) koja, nanescena na prozirnu foliju, može biti standard s kojim se uspoređuju ostali rezultati.

3.2.5. Određivanje mikrobiološke aktivnosti

Ispitivanje mikrobiološke aktivnosti provedeno je prema standardnim metodama u Centru za kontrolu namirnica, Jagićeva 31 (akreditirani laboratorij PBF-a).

Analizama se određivala prisutnost aerobnih mezofilnih bakterija, kvasaca, plijesni te bakterija *Salmonella* i *Enterobacteriaceae*. Metode koje su se koristile su HRN EN ISO 4833:2008 za aerobne mezofilne bakterije, HRN ISO 21527:2008 za kvasce i plijesni, HRN EN ISO 6579:2003 za bakteriju *Salmonellae* te HRN ISO 21528-1:2008 za bakteriju *Enterobacteriaceae*.

Tablica 1. Kriteriji za ispitivanje mikrobiološke aktivnosti

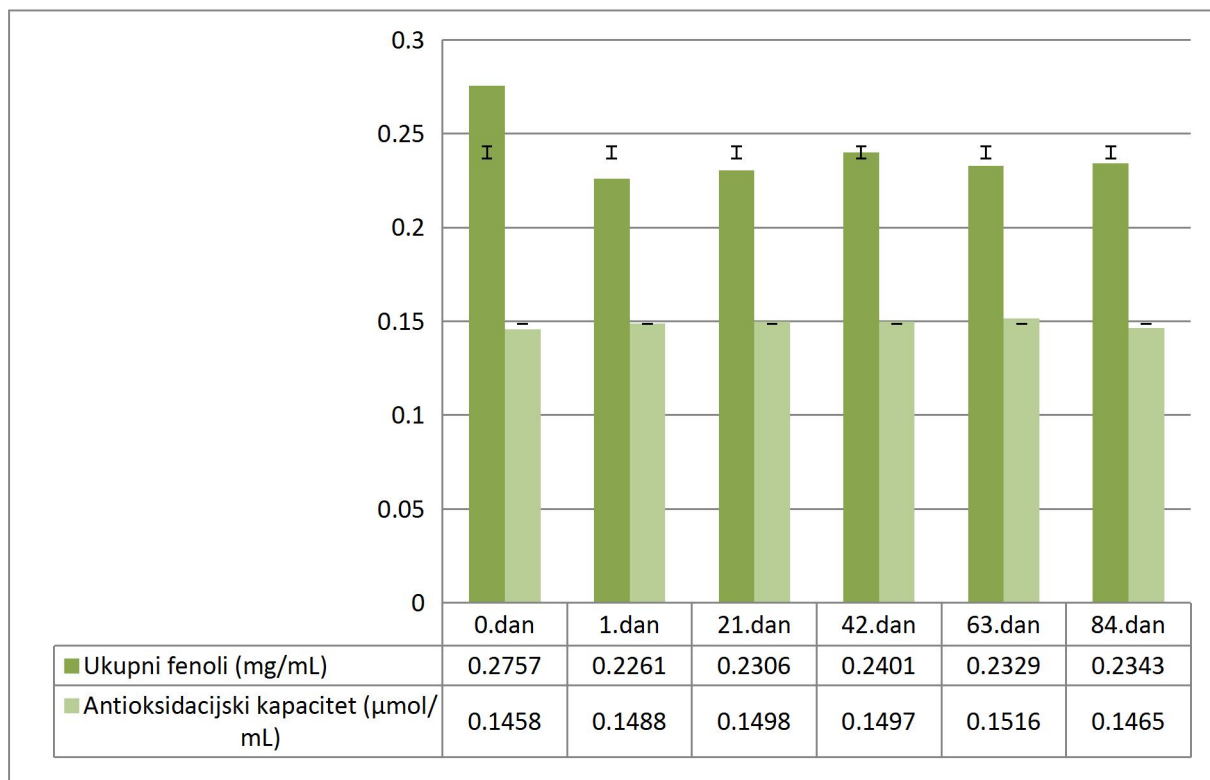
Mikrobiološka ispitivanja	Kriteriji *
Bakterija <i>Salmonella</i>	Nije izolirana
Bakterija <i>Enterobacteriaceae</i>	<1
Aerobne mezofilne bakterije	<10
Kvasci	<1
Plijesni	<1

* Ministarstvo poljoprivrede, Vodič za mikrobiološke kriterije za hranu, 3. izmijenjeno izdanje, ožujak, 2011.

3.3. Rezultati i rasprava

3.3.1. Koncentracija ukupnih fenola i antioksidacijski kapacitet

Sadržaj ukupnih fenola i antioksidacijski kapacitet određeni su spektrofotometrijski te su rezultati prikazani na slici 6. Prikazane su srednje vrijednosti dva mjerenja i standardna devijacija.



Slika 6. Koncentracije ukupnih fenola (mg/mL) i antioksidacijski kapacitet (μL/mL) u napitku lista masline skladištenog na 8 °C

Ukupni fenoli

Koncentracija ukupnih fenola (Slika 6) kretala se u rasponu od 0,2261 mg/mL do 0,2757 mg/mL. Vrijednosti su nakon 1. dana postepeno rastle sve do 42. dana, nakon čega su se smanjile pa opet povećale. Međutim, sve te promjene su vrlo blizu početnim vrijednostima.

Buyukbalcy i sur. (2008.) su mjerili sadržaj ukupnih fenola u pripremljenom dekoktu od lista masline te je iznosio 70 mg CE/L. Za pripremu dekokta koristili su 5 g lišća i 100 mL vode.

Lišće je kuhano 15 minuta, nakon čega je odstajalo 10 minuta u vodi. Dobivena vrijednost koncentracije ukupnih fenola gotovo je 3 puta manja od one izmjerene u ovom istraživanju.

Makris i sur. (2007.) istraživali su koncentraciju ukupnih fenola u lišću maslina te ih uspoređivali s koncentracijom fenola drugih biljaka (grejpa, krumpira i luka). Lišće su očistili i osušili te čuvali na -40 °C. Rezultati su pokazali kako lišće sadrži 2,058 GAE (ekvivalent galne kiseline) na 100 g, što je manje nego u ovom istraživanju. Zaključak istraživanja bio je da ekstrakt sadrži više polifenola nego suho lišće.

Ahmad-Quasem i sur. (2015.) mjerili su ukupnu koncentraciju fenola u ekstraktu lista masline (etanol-voda, 80:20) skladištenog 28 dana pri 4° C, pri čemu su mjerenja izvođena svakih 7 dana. Zaključak istraživanja bio je da se vremenom koncentracija ukupnih fenola nije značajno promijenila.

Antioksidacijski kapacitet

Vrijednosti za antioksidacijski kapacitet (Slika 6) kretale su se u rasponu od 0,1458 µg/mL do 0,1516 µg/mL. Sve izmjerene vrijednosti su približno iste (nije došlo do značajnih promjena vrijednosti), što ukazuje na to da skladištenje ne utječe negativno na promjenu antioksidacijskog kapaciteta.

Jiménez-Zamora i sur. (2016.) određivali su antioksidacijski kapacitet DPPH metodom čaja od lista masline koji se skladištio 3 i 6 mjeseci pri 50 °C. Pripremili su 2 g lišća masline, prelili ga sa 150 mL kipuće vode i ostavili na sobnoj temperaturi 7 minuta (Priprema je relativno slična pripremi napitka u ovom istraživanju). Na dan pripreme čaja antioksidacijski kapacitet iznosio je 1,29 mmol TE/L, što je puno veća vrijednost od one određene u ovom istraživanju. Nakon 3 mjeseca skladištenja, antioksidacijski kapacitet iznosio je 0,48 mmol TE/L, dok je nakon 6 mjeseci vrijednost porasla na 0,63 mmol TE/L.

Ahmad-Quasem i sur. (2015.) mjerili su antioksidacijski kapacitet fenola u ekstraktu lista masline (etanol-voda, 80:20) skladištenog 28 dana pri 4° C, pri čemu su mjerenja izvođena svakih 7 dana. Zaključak studije bio je da se vremenom antioksidacijski kapacitet nije značajno promijenio.

3.3.2. Boja

Vrijednosti L^* , a^* i b^* određene su kolorimetrijski, a vrijednosti C , H° i ΔE izračunate su prema prethodno navedenim formulama. U tablici 2 su prikazane srednje vrijednosti tri mjerenja i standardna devijacija.

Tablica 2. Parametri boje određeni za napitak lista masline skladištenog na 8 °C

Dan skladištenja, t=8 °C	L^*	a^*	b^*	C	H°	ΔE
0.dan	91,14±0,49	-1,98±0,12	19,18±0,14	19,29±0,15	95,89±0,30	0
1.dan	94,22±0,03	-1,99±0,01	18,51±0,07	18,61±0,06	96,13±0,06	3,16
21.dan	93,09±0,05	-0,88±0,01	20,43±0,05	20,45±0,05	92,46±0,02	2,57
42.dan	91,77±0,02	-0,39±0,02	22,16±0,01	22,16±0,01	91,02±0,05	3,43
63.dan	90,97±0,04	-0,02±0,02	23,78±0,01	23,78±0,01	90,05±0,04	4,99
84.dan	90,39±0,03	0,24±0,0	25,74±0,0	25,74±0,0	89,42±0,01	6,97

Vrijednosti za L^* kretale su se u rasponu od 90,39 do 94,22. Najveća vrijednost zabilježena je 1. dan skladištenja te je postupno padala kako je trajalo skladištenje. Na kraju je njezina vrijednost iznosila 90,39. Takvo smanjenje L^* vrijednosti ukazuje na tamnjenje napitka tijekom skladištenja.

Vrijednosti za a^* kretale su se u rasponu od -1,99 do 0,24. Najniža vrijednost zabilježena je 1. dan skladištenja (-1,99) te se postupno povećavala kako je trajalo skladištenje. Na kraju skladištenja njezina vrijednost je postala pozitivna (0,24). Promjena a^* vrijednosti od negativne prema pozitivnoj ukazuje na udio crvene boje jer iz blago zelenih nijansi ($-a^*$ vrijednost) prelazi u crvenkaste nijanse ($+a^*$ vrijednost), što ukazuje na tamnjenje napitka.

Vrijednosti za b^* kretale su se u rasponu od 18,51 do 25,74. Najniža vrijednost zabilježena je 1. dan skladištenja te je postupno rasla kako je trajalo skladištenje. Vrijednost b^* pokazuje udio žute boje, te je u ovom slučaju vidljivo kako se povećava udio žute boje. Takav porast udjela žute boje također ukazuje na tamnjenje napitka.

Vrijednosti za C kretale su se između 18,61 i 25,74. Najniža vrijednost zabilježena je 1. dan skladištenja te je postupno rasla kako je trajalo skladištenje. Vrijednosti za C predstavljaju zasićenost boje. Porast zasićenosti također ukazuje na tamnjenje napitka.

Vrijednosti za H° kretale su se između 89,42 i 96,13. Najviša vrijednost bila je zabilježena 1. dan skladištenja te je postupno padala kak je trajalo skladištenje. Vrijednost H° predstavlja vizualni doživljaj boje (ton boje) te pad njegove vrijednosti ukazuje na veći udio crvene boje.

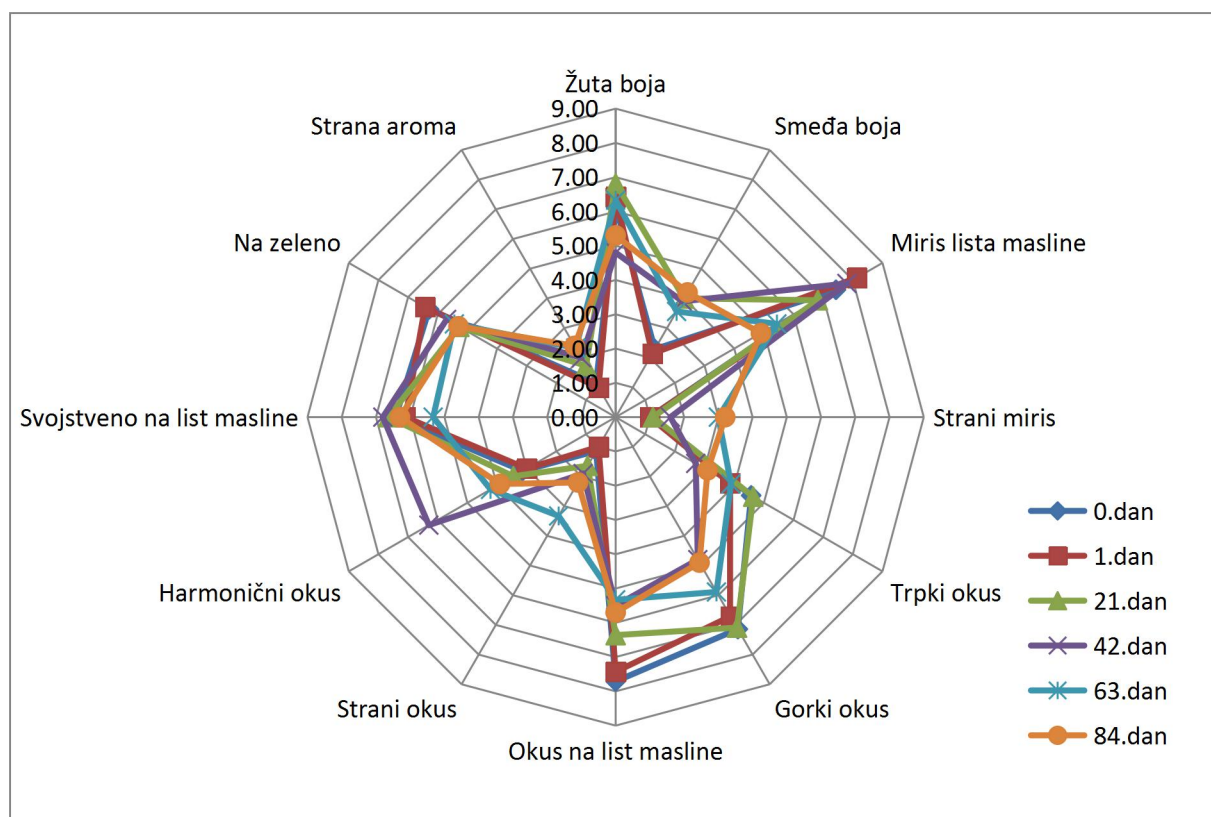
ΔE ili ukupna razlika obojenosti kretala se u rasponu od 2,57 do 6,97. od 1. do 21. dana vrijednost se smanjila, dok se u nastavku skladištenja vrijednost postupno povećavala.

Sve navedene promjene ukazuju na promjenu boje prilikom skladištenja napitka, tj. ukazuju na tamnjenje napitka tijekom vremena.

Kozak i sur. (2007.) određivali su parametre boje L^* , a^* i b^* prema CIE Lab ljestvici za biljne čajeve kadulje, kamilice i matičnjaka u obliku granuliranog praha te su ih uspoređivali s instant čajevima. L^* vrijednosti bile su najveće kod čajeva kuhanih 3 minute (51,28 za kadulju, 56,10 za kamilicu i 47,76 za matičnjak) što ukazuje na to da su oni bili najsvjetliji, dok su čajevi kuhani 10 minuta bili tamniji (49,28 za kadulju, 49,84 za kamilicu i 40,20 za matičnjak). Sve vrijednosti parametra a^* bile su negativne (zelene nijanse), a parametra b^* pozitivne (veći udio žute boje).

3.3.3. Senzorska svojstva

Rezultati senzorskih ispitivanja prikazani su grafički pomoću tzv. paukove mreže na slici 7.



Slika 7. Rezultati senzorskog ocjenjivanja napitka od lista masline skladištenog na 8 °C

Žuta boja napitka bila je najizraženija 21. dana skladištenja, a do tada je rasla. Nakon 21. dana intenzitet boje pada, a onda do 64. dana opet raste. Od 64. dana do kraja skladištenja intenzitet se opet smanjio. Gledajući odnos početka i kraja skladištenja, može se zaključiti da se smanjio intenzitet žute boje napitka.

Što se tiče intenziteta smeđe boje, može se zaključiti da se vrijednost postupno povećava tijekom skladištenja. Na početku skladištenja pa sve do 42. dana intenzitet raste, dok se nakon toga neznatno smanjuje pa opet povećava. Ovakve promjene vrijednosti u skladu su s izmjerenim i izračunatim smanjenjem L^* i H^0 vrijednosti te povećanjem a^* , b^* i ΔE vrijednosti.

Miris na list masline najizraženiji je 1. dan, a skladištenjem se sve manje osjeti. Od 21. do 42. dana se povećao, a nakon toga do kraja skladištenja vrijednosti padaju.

Strani miris se najmanje osjetio na početku skladištenja, a vremenom se postupno povećava prisutnost stranog mirisa u napitku.

Trpki okus je najizraženiji na početku skladištenja. Međutim, vrijednosti tijekom skladištenja variraju. Od 1. do 21. dana vrijednost raste, a nakon toga do 42. dana vrijednost pada. Do 63. dana opet raste prisutnost trpkog okusa, a do kraja skladištenja ta vrijednost pada. Sveukupno, može se zaključiti da je prisutnost trpkog okusa manja na kraju, nego na početku.

Gorki okus je najviše izražen 0. dan skladištenja te se nakon toga vrijednosti skokovito mijenjaju. Naime, od 1. do 21. dana vrijednost pada, nakon čega opet raste pa pada. Na kraju skladištenja vrijednost je manja nego na početku pa se može zaključiti da se smanjila prisutnost gorkog okusa u napitku.

Okus na list masline najviše se osjeti na početku skladištenja (0. dan) te se nakon toga vremenom sve manje osjeti. Dakle, skladištenjem se postupno gubi okus na list masline.

Strani okus je najviše prisutan 63. dan skladištenja. Od početka skladištenja pa do 63. dana prisutnost stranog okusa je sve veća, dok se od 63. dana do 84. dana prisutnost smanjila. Može se zaključiti da se od početka do kraja skladištenja prisutnost stranog okusa povećala, ali u toliko maloj mjeri da nije negativno utjecala na senzorska svojstva napitka.

Harmonični okus je najizraženiji 42. dan skladištenja. Do tada vrijednosti postepeno rastu, a nakon 42. dana vrijednosti padaju. Iako pred kraj skladištenja vrijednosti padaju, može se zaključiti da se od početka do kraja skladištenja harmonični okus pojačao.

Aroma svojstvena na list masline je najizraženija 42. dan skladištenja. Do tada vrijednosti postepeno rastu, a nakon toga padaju pa rastu. Može se zaključiti da skladištenje ne utječe značajno na gubitak arome na list masline.

Aroma na zeleno je najizraženija 1. dan skladištenja, nakon čega dolazi do pada pa ponovnog rasta vrijednosti. Može se zaključiti da skladištenje ne utječe značajno na gubitak arome na zeleno.

Strana aroma se postepeno povećavala kako je trajalo skladištenje te je najveća prisutnost strane arome na kraju skladištenja. Međutim, ta prisutnost je toliko mala da ne utječe negativno na senzorska svojstva napitka.

3.3.4. Mikrobiološka ispitivanja

Tablica 3. Rezultati mikrobiološke analize napitka od lista masline skladištenog na 8 °C

Mikrobiološka ispitivanja	0.dan	1.dan	21.dan	42.dan	63.dan	84.dan
Bakterija <i>Salmonella</i>	-	-	Nije izolirana	Nije izolirana	Nije izolirana	Nije izolirana
Bakterija <i>Enterobacteriaceae</i>	-	-	<1	<1	<1	
Aerobne mezofilne bakterije	30	30	10	10	40	
Kvasci	<10	<10	<1	<1	<1	
Plijesni	<10	<10	<1	<1	<1	

Iz tablice je vidljivo kako većina mikrobioloških ispitivanja ispunjava navedene kriterije (Tablica 1.) za prisutnost određenih mikroorganizama u napitku. Bakterije *Salmonella* i *Enterobacteriaceae* ispunjavaju navedene kriterije (*Salmonella* nije izolirana, dok je vrijednost za prisutnost *Enterobacteriaceae* iznosila <1 što ispunjava kriterije). Kriterij za aerobne mezofilne bakterije je <10, međutim u svim ispitivanjima je vrijednost bila viša (ili jednaka 10). To može ukazivati na nepravilnosti tijekom punjenja i zatvaranja posuda, a ne na negativan utjecaj skladištenja. Kvasci i plijesni su na početku skladištenja prisutni u količini većoj od propisane, međutim u nastavku skladištenja ispunjavaju kriterij. To također može ukazivati na nepravilnosti tijekom same pripreme napitka za skladištenje, a ne na negativan utjecaj skladištenja.

4. ZAKLJUČAK

Iz dobivenih rezultata istraživanja može se zaključiti sljedeće:

- Tijekom skladištenja ne dolazi do velike promjene koncentracije ukupnih fenola, a koncentracije su se kretale u rasponu od 0,276 mg/mL na početku do 0,234 mg/mL na kraju skladištenja.
- Skladištenjem ne dolazi do velike promjene antioksidacijskog kapaciteta, a vrijednosti su se kretale u rasponu od 0,146 $\mu\text{mol/mL}$ na početku do 0,152 $\mu\text{mol/mL}$ na kraju skladištenja.
- Skladištenjem napitka dolazi do tamnjenja boje, na što ukazuju povećanje a^* (crvene nijanse), b^* (veći udio žute boje), C (veća zasićenost) i L^* (tamnija boja, u rasponu od 90,39 do 94,22) vrijednosti te smanjenje H^o vrijednosti (veći udio crvenih nijansi).
- Senzorskom analizom se ustvrdilo da dolazi do tamnjenja napitka tijekom vremena. Aroma svojstvena na list masline i na zeleno, miris i okus na list masline, trpki i gorki okus se smanjuju, dok se harmoničnost okusa povećava skladištenjem napitka.
- Skladištenje napitka nije negativno utjecalo na njegova mikrobiološka svojstva.

5. LITERATURA

Ahmad-Qasem M.H., Ahmad-Qasem B.H., Barrajon-Catalan E., Micol V., Cárcel J.A., García-Pérez J.V (2016) Drying and storage of olive leaf extracts. Influence on polyphenols stability. *Industrial Crops and Products* **79**: 232–239.

Anonymus 1 < <http://www.maslinovo.hr/sadrzaj/20130927/27092013033206-2-maslinov-list.jpg> > Pristupljeno 07. Rujna 2017.

Anonymus 2 < <http://www.naturallivingideas.com/wp-content/uploads/2016/11/olive-leaf-extract.jpg> > Pristupljeno 07. Rujna 2017.

Barbaro B., Toietta G., Maggio R., Arciello M., Tarocchi M., Galli A., Balsano C. (2014) Effects of the Olive-Derived Polyphenol Oleuropein on Human Health. *International Journal of Molecular Sciences* **15**: 18508-18524.

Benavente-Garcia O., Castillo J., Lorente J., Ortuno A., Del Rio J.A. (2000) Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. Leaves. *Food Chemistry* **68**: 457 - 462.

Brahmi F., Mechri B., Dabbou S., Dhibi M., Hammami M. (2012) The efficacy of phenolics compounds with different polarities as antioxidants from olive leaves depending on seasonal variations. *Industrial Crops and Products* **38**: 146-152.

Braun L., Cohen M. (2015) An Evidence-Based Guide. *Herbs and Natural Supplements* **2**

Büyükbacı A., Nehir El S. (2008) Determination of In Vitro Antidiabetic Effects, Antioxidant Activities and Phenol Contents of Some Herbal Teas. *Plant Foods for Human Nutrition* **63**: 27 – 33.

CIE, Commission Internationale de l'Eclairage (1976) Official recommendations on uniform colour spaces, colour differences equations and metric colour terms. Paris: France.

Delgado-Pertinez M., Gomez-Cabrera A., Garrido A. (2000) Predicting the nutritive value of the olive leaf (*Olea europaea*): digestibility and chemical composition and in vitro studies. *Animal Feed Science and Technology* **87**: 187 - 201.

Ennajeh M., Vadel A.M., Khemira H. (2009) Osmoregulation and osmoprotection in the leaf cells of two olive cultivars subjected to severe water deficit. *Acta Physiologiae Plantarum* **31**: 711–721.

Erbay Z., Icier F. (2010) The Importance and Potential Uses of Olive Leaves. *Food Reviews International* **26**: 319 - 334.

Gamli O.F. (2016) The health effects of oleuropein, one of the major phenolic compounds of olives, *Olea europea* L. *Italian Journal of Food Science* **28**: 178-189

Gao X.H., Zhang L, Wei H., Chen H.D. (2008) Efficacy and safety of innovative cosmeceuticals. *Clinics in Dermatology* **26**: 367–374

Haddadin M.S.Y. (2010) Effect of Olive Leaf Extracts on the Growth and Metabolism of Two Probiotic Bacteria of Intestinal Origin. *Pakistan Journal of Nutrition* **9**: 787-793.

Hata S. (2004) Effect of drying temperature on the oleuropein content of olive (*Olea europea* L.) leaves. *Food Preservation Science* **30**: 191–193.

HRN EN ISO 6579:2003, Hrana i hrana za životinje -- Horizontalna metoda za otkrivanje *Salmonella* spp.

HRN ISO 21528-1:2008, Hrana i hrana za životinje, Metoda za brojanje bakterija iz porodice Enterobacteriaceae bez ponovnog ožljavanja – postupak brojenja kolonija

HRN EN ISO 4833-1:2013, Mikrobiologija lanca hrane -- Horizontalna metoda za određivanje broja mikroorganizama -- 1. dio: Određivanje broja kolonija pri 30 °C tehnikom zalijevanja podloge

ISO 21527-1:2008, Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds – Part 1: colony count technique in products with water activity greater than 0,95

Japón-Luján R., Luque de Castro M.D. (2008) Liquid–Liquid Extraction for the Enrichment of Edible Oils with Phenols from Olive Leaf Extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**: 2505–2511.

Jiménez-Zamora A., Delgado-Andrade C., Rufián Henares J.A. (2016) Antioxidant capacity, total phenols and color profile during the storage of selected plants used for infusion. *Food Chemistry* **199**: 339 – 346

Kamran M., Hamlin A.S., Scott C.J., Obied H.K. (2015) Drying at high temperature for a short time maximizes the recovery of olive leaf biophenols. *Industrial Crops and Products* **78**: 29–38.

Khemakhem I., Abdelhedi O., Trigui I., Ali Ayadi M., Bouaziz M. (2017) Structural, antioxidant and antimicrobial activities of polysaccharides extracted from olive leaves. *International Journal of Biological Macromolecules*.

Kozak M., Sobczak P., Krajewska M., Ślaskagrzyczna B., Wojtowitz A., Jukiewicz-Sobczak W. (2017) Evaluation of health promoting properties and quality of herbal teas obtained from fine-grained fraction of herbs. *Journal of Central European Agriculture* **18**: 388 - 402.

Lee O. H., Lee B.Y. (2010) Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in *Olea europea* leaf extract. *Bioresource Technology* **101**: 3751-3754.

Makris D.P., Boskou G., Andrikopoulos N.K. (2007) Polyphenolic content and in vitro antioxidant characteristics of wine industry and other agri-food solid waste extracts. *Journal of Food Composition and Analysis* **20**: 125-132.

Malik N., Bradford J.M. (2008) Recovery and stability of oleuropein and other phenolic compounds during extraction and processing of olive (*Olea europea* L.) leaves. *Journal of Food, Agriculture and Environment* **6**: 8-13.

Marhamatizadeh M. H., Ehsandoost E., Gholami P., Mohaghegh M. D. (2013). Effect of olive leaf extract on growth and viability of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* for production of probiotic milk and yoghurt. *International Journal of Farming and Allied Sciences* **2**: 572–578.

Martin-Garcia A.I., Moumen A., Yanez-Ruiz D.R., Molina-Alcaide E. (2003) Chemical composition and nutrients availability for goats and sheep of two-stage olive cake and olive leaves. *Animal Feed Science and Technology* **107**: 61 - 74.

Martin-Garcia A.I., Molina-Alcaide E. (2008) Effect of different drying procedures on the nutritive value of olive (*Olea europaea* var. *europaea*) leaves for ruminants. *Animal Feed Science and Technology* **142**: 317 - 329.

Melgar J.C., Guidi L., Remorini D., Agati G., Degl'innocenti E., Castelli S., Tattini M. (2009). Antioxidant defences and oxidative damage in salt-treated olive plants under contrasting sunlight irradiance. *Tree Physiology* **29**: 1187–1198.

Molina-Alcaide E., Yáñez-Ruiz D.R. (2008) Potential use of olive by-products in ruminant feeding: A review. *Animal Feed Science and Technology* **147**: 247–264.

Ozcan M. M., Matthaus B. (2016) A review: benefit and bioactive properties of olive (*Olea europea* L.) leaves. *European Food Research and Technology* **243**: 89-99.

Petridis A., Therios I., Samouris G., Koundouras S., Giannakoula A. (2012c). Effect of water deficit on leaf phenolic composition, gas exchange, oxidative damage and antioxidant activity of four Greek olive (*Olea europaea* L.) cultivars. *Plant Physiology and Biochemistry* **60**: 1–11.

Prior R.L., Wu X.L., Schaich K. (2005) Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**: 4290 - 4302.

Ranalli A., Contento S., Lucera L., Di Febo M., Marchegiani D., Di Fonzo V. (2006) Factors affecting the contents of iridoid oleuropein in olive leaves (*Olea europaea* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**: 434–440.

Sahin S., Malik N.S.A., Perez J.L., Brockington J.E. (2012) Seasonal Changes of Individual Phenolic Compounds in Leaves of Twenty Olive Cultivars Grown in Texas. *Journal of Agricultural Science and Technology* **2**: 242–247.

Sahin S., Bilgin M. (2017) Olive tree (*Olea europea* L.) leaf as a waste by-product of table olive and olive oil industry: A review. *Journal of The Science of Food and Agriculture*

Salem M.B., Affes H., Ksouda K., Sahnoun Z., Zeghal K.M., Hammami S. (2015) Pharmacological Activities of *Olea europaea* Leaves. *Journal of Food Processing and Preservation* **39**: 3128–3136.

Savarese M., De Marco E., Sacchi R. (2007) Characterization of phenolic extracts from olives (*Olea europaea* cv. Pisciottana) by electrospray ionization mass spectrometry. *Food Chemistry* **105**: 761–770.

Shortle E., O'Grady M.N., Gilroy D., Furey A., Quinn N., Kerry J.P. (2014) Influence of extraction technique on the anti-oxidative potential of hawthorn (*Crataegus monogyna*) extracts in bovine muscle homogenates. *Meat Science* **98**: 828 - 834.

Shirzad H., Niknam V., Taheri M., Ebrahimzadeh H. (2017) Ultrasound-assisted extraction process of phenolic antioxidants from Olive leaves: a nutraceutical study using RSM and LC–ESI–DAD–MS. *Journal of Food Science and Technology* **54**: 2361-2371.

Silva S., Comes L., Leitao F., Coelho A.V., Boas L.V. (2006) Phenolic compounds and antioxidant activity of *Olea europaea* L. fruits and leaves. *Food Science and Technology International* **12**: 385–396.

Sito S., Dovečer S., Borić V., Ploha M., Borić M. (2015) Uređaji i oprema za proizvodnju čaja od maslinovog lista. *Glasnik zaštite bilja* **38**: 28 - 32.

Souilem S., Fki I., Kobayashi I., Khalid N., Neves M.A., Idosa H., Sayadi S., Nakajima M. (2017) Emerging Technologies for Recovery of Value-Added Components from Olive Leaves and Their Applications in Food/Feed Industries. *Food and Bioprocess Technology* **10**: 229-248.

Sedef N., Karakaya S. (2009) Olive tree (*Olea europea*) leaves: potential beneficial effects on human health. *Nutrition Reviews* **67**: 632-638.

Stamatopoulos K., Chatzilazarou A., Katsoyannos E. (2013) Optimization of Multistage Extraction of Olive Leaves for Recovery of Phenolic Compounds at Moderated Temperatures and Short Extraction Times. *Foods* **3**: 66-81.

Stamatopoulos K., Katsoyannos E., Chatzilazarou A. (2014) Antioxidant Activity and Thermal Stability of Oleuropein and Related Phenolic Compounds of Olive Leaf Extract after Separation and Concentration by Salting-Out-Assisted Cloud Point Extraction. *Antioxidants* **3**: 229-244.

Stone H., Bleibaum R., Thomas H. A. (2012) Sensory evaluation practices. Academic press.

Talhaoui N., Taamalli A., Gomez-Caravaca A.M., Fernandez-Gutierrez A., Segura-Carretero A. (2015) Phenolic compounds in olive leaves: Analytical determination, biotic and abiotic influence, and health benefits. *Food Research International* **77**: 92 - 108.

Tsimidou, M.Z., & Papoti, V.T. (2010). Bioactive ingredients in olive leaves. In V.R. Preedy, & R.R. Watson (Eds.), *Olives and olive oil in health and disease prevention* (pp. 349–356). Elsevier Inc

Tuck K.L., Hayball P.J. (2002) Major phenolic compounds in olive oil: Metabolism and health effects. *The Journal Of Nutritional Biochemistry* **13**: 636 – 644.

Xie P., Huang L., Zhang C., Zhang Y. (2015). Phenolic compositions, and antioxidant performance of olive leaf and fruit (*Olea europaea* L.) extracts and their structure–activity relationships. *Journal of Functional Foods* **16**: 460-471.

Zorić N., Kopjar N., Kraljić K., Oršolić N, Tomić S., Kosalec I. (2016) Olive leaf extract activity against *Candida albicans* and *C. dubliniensis* – the in vitro viability study. *Acta Pharmaceutica* **66**: 411–421.

6. PRILOZI

6.1. Ocjenjivački listić

[illegible]

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mog rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

ime i prezime studenta